



⑭ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 08 055 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 N 5/08
C 12 N 5/06
C 12 M 3/00

②① Aktenzeichen: 198 08 055.7
②② Anmeldetag: 27. 2. 98
④③ Offenlegungstag: 2. 9. 99

DE 198 08 055 A 1

⑦① **Anmelder:**

Adamietz, Peter, Dr.rer.nat., 22145 Hamburg, DE;
Meenen, Norbert M., Dr., 22587 Hamburg, DE;
Nehring, Dirk, Dipl.-Ing., 21075 Hamburg, DE;
Pörtner, Ralf, Dr.-Ing., 21614 Buxtehude, DE

⑦② **Erfinder:**

gleich Anmelder

⑤⑤ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:**

DE	42 00 446 C2
DE	39 23 279 C2
DE	195 40 487 A1
US	56 65 599
US	53 16 945

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤④ **Verfahren und Apparatur zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebezellkulturen**

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebezellkulturen auf speziellen Trägermaterialien, eine Apparatur zur zyklischen oder permanenten mechanischen Belastung des Zell-Strukturat-Komplexes sowie Verwendungen der Verfahren und Apparaturen.

DE 198 08 055 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur Herstellung von dreidimensionalen Gewebezellkulturen auf speziellen Trägermaterialien, eine Apparatur zur zyklischen oder permanenten mechanischen Belastung des Zell-Struktur-Komplexes sowie Verwendungen der Verfahren und Apparaturen.

Anwendungsgebiete

Beim sog. "Tissue Engineering" ist es das Ziel, künstliche Bindegewebs- und Epithelgewebe sowie neuronale Organoiden mittels Zellen, die auf verschiedensten Biomatrizes (Strukturen) kultiviert werden, zu erstellen. Gefordert ist die Herstellung von Gewebestrukturen mit speziellen, möglichst körperspezifischen Eigenschaften. Anwendungsbereiche für das "Tissue Engineering" sind etwa die Implantatherstellung (Generierung von Binde- und Stützgeweben, funktionellen Epithelien, Gefäßen oder Gewebesystemen (Leber, Knorpel etc.)), physiologische Untersuchungen an "in vitro"-Gewegekulturen (Medium, Metabolismus etc.), Kompatibilitätsuntersuchungen an Biomaterialien oder Verträglichkeitsprüfungen von Medikamenten. Bei der Herstellung von Knorpelimplantaten ist es zusätzlich zu der differenzierten Technik des "Tissue Engineering" nach dem derzeitigen Stand des Wissens erforderlich, die physiologische Funktionalität durch mechanische Belastung (zyklisch, statisch) zu verbessern.

Stand der Technik

Bei der Herstellung von funktionsfähigen Geweben kann in mehreren Schritten vorgegangen werden, wobei der zentrale Punkt die Steuerung der Differenzierung im kultivierten Gewebe ist. In einem ersten Schritt werden die Zellen in Flaschenkulturen vermehrt. Für die weitergehende Kultivierung sieht ein Konzept, wie es z. B. Minut et al. (1) vorschlagen, vor, die Zellen auf eine spezielle Gewebeunterlage aufzubringen. Hierbei kann es sich um Filterunterlagen, Vliese oder Matrices mit einer Schwammstruktur, ggf. aus bioabbaubaren Polymeren handeln. Die so erstellten Gewebe werden anschließend in eine Perfusionskammer eingebracht, in der eine verbesserte und kontrollierte Versorgung mit Substraten und Sauerstoff sowie eine Entsorgung von Stoffwechselprodukten stattfinden kann.

Vorrichtungen und Verfahren für die Anzucht von Gewebezellen sind bekannt. Von Minuth (1-3) wird ein Perfusionsgerät beschrieben, in dem die Zellen auf einer geeigneten Unterlage in einem Gewebeträger aufwachsen können. Letzterer wird anschließend in einen Kulturcontainer eingesetzt und permanent mit frischem Medium durchströmt. In einem speziellen Gradientencontainer lassen sich bis zu 6 Gewebeträger unterbringen.

Die genannte Vorrichtung hat mehrere Nachteile. Das Aufbringen der Zellen auf dem Gewebeträger sowie dessen Einsetzen in den Kulturcontainer muß manuell mit Hilfe von Pipetten und Pinzetten erfolgen. Diese Vorgehensweise ist mit einem hohen Kontaminationsrisiko verbunden und die Zellen lassen sich nicht in den notwendigen hohen Dichten auf das Trägermaterial aufbringen. Zudem lassen sich nur flächige Trägermaterialien verwenden, nicht jedoch partikelförmige, wie sie etwa bei der Erstellung von Knorpelstrukturen erforderlich sind.

Des weiteren lassen sich bei den genannten Apparaturen auf Grund der Konstruktion keine mechanischen Belastungen auf die kultivierten Zellen aufbringen. Generell ist festzustellen, daß Versuche mit mechanischer Belastung bislang

zwar in statischen Kulturen durchgeführt und veröffentlicht wurden (4), ein System mit kontinuierlicher Versorgung der Zellen während der Belastung bisher aber nicht vorgestellt wurde.

Bei dem neuartigen Verfahren werden die Zellen in einem speziellen Zentrifugationseinsatz mit variabler Dichte auf ein Trägermaterial aufzentrifugiert. Das Unterteil des Zentrifugationseinsatzes wird anschließend in eine speziell konstruierte Fließkammer eingesetzt, in der die Zellen kontinuierlich mit frischem Medium versorgt werden können. Die Aufbringung mechanischer Kompression oder hydrostatischen Druckes über Stößel bietet die Möglichkeit der mechanischen Stimulation der Zellen.

Vorteile der Erfindung sind einerseits in der Minimierung der Arbeitsgänge und damit der Fehlerquellen (Unsterilität) sowie der zuverlässigeren Durchführbarkeit zu sehen. Des weiteren lassen sich durch die Zentrifugation schon bei der Erstellung des Gewebepellets die für die Chondrogenese optimalen Zelldichten einstellen. Die geometrische Struktur des Gewebepellets kann klar definiert werden. Der Betrieb in der Fließkammer erlaubt es, definierte und reproduzierbare Prozeßbedingungen einzustellen und die Prozeßparameter zu kontrollieren. Durch Ergänzung mit einer Dialysestufe lassen sich inhibierende niedermolekulare Metabolite ohne Verlust an unersetzbaren parakrinen Faktoren abtrennen oder auch höhermolekulare Faktoren in geringeren Dosen zufüttern.

Die zyklische mechanische Belastung der Zellen ermöglicht die Simulation von "in vivo" Zuständen und die Stimulation der Produktion von Matrixbestandteilen sowie die Umstrukturierung der interzellularen Substanzen. Dies kann bei dieser Erfindung über längere Zeiträume als bei statischen Kulturen geschehen, da eine kontinuierliche Versorgung sichergestellt ist.

Beschreibung von Ausführungsbeispielen

Weitere Merkmale, Einzelheiten und Vorzüge der Erfindung sind in den Zeichnungen dargestellt und werden im folgenden beschrieben.

Abbildungen

Fig. 1: Ablaufschema inkl. mechanischer Belastung,
Fig. 2: Schema Gesamtreaktor,
Fig. 3: Konstruktionszeichnung des Zentrifugationseinsatzes,
Fig. 4: Konstruktionszeichnung Kulturkammer,
Fig. 5: Konstruktionszeichnung Belastungsapparatur,

Fig. 1: Ablaufschema inkl. mechanischer Belastung

Fig. 1 verdeutlicht ein mögliches Anwendungsgebiet des neuartigen Verfahrens, die Gewinnung autologer Knorpelproben für die Implantation. In einem ersten Schritt (1) wird gesundes Knorpelgewebe entnommen. Die Zellen werden in einem Verdauungsschritt (2) vereinzelt und in Kulturflaschen ausgesät. In der Proliferationsphase kann die Matrixsynthese durch geeignete Maßnahmen zugunsten einer erhöhten Mitoserate weitgehend abgeschaltet werden. Sind ausreichend Zellen vorhanden, werden diese in einem speziellen Zentrifugationseinsatz auf ein Trägermaterial (z. B. Hydroxyapatit) zu einem Zellpellet zentrifugiert (3). Es ist bekannt, daß Chondrozyten unter solchen Kulturbedingungen redifferenzieren und mit der Sekretion der für die Ausbildung des Knorpels wichtigen Substanzen beginnen.

Nach der Zentrifugation werden die Zellpellets in eine Fließkammer für Gewegekulturen eingesetzt (4). In dieser

Phase kann durch Aufbringen von mechanischer Belastung die Ausbildung der Knorpelmatrix verbessert werden. Nach wenigen Wochen hat sich ein implantierbares Knorpelpellet gebildet, das entnommen (5) wird und anschließend in das defekte Gelenk eingebracht wird (6).

Fig. 2: Schema Gesamtreaktor

Fig. 2 zeigt eine mögliche Ausführungsform des Anzucht-Reaktors bestehend aus einer Kulturkammer (1), einem Vorlagegefäß für das Kulturmedium (2) sowie einer Umwälzpumpe (3). Kulturkammer und Vorlagegefäß werden temperiert. In der Kulturkammer, die in Fig. 4 im Detail beschrieben wird, erfolgt die Anzucht der Gewebe-Zellpellets. Im Vorlagegefäß erfolgt die Begasung und Durchmischung des Kulturmediums sowie die Probenahme. Ergänzend können Meßsonden zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration oder des pH-Wertes eingesteckt werden. Das Kulturmedium wird entweder satzweise (batch) oder kontinuierlich ausgetauscht. Mit Hilfe der Umwälzpumpe wird das Medium aus dem Vorlagegefäß durch die Kulturkammer und zurück gepumpt.

Fig. 3: Konstruktionszeichnung Zentrifugationseinsatz

Fig. 3 zeigt den Zentrifugationseinsatz bestehend aus einem Einsatz für die Zellpellets (1) mit einer Vertiefung für die Aufnahme des Zellträgers (4) und einem Oberteil (2), daß durch ein Diaphragma (3) verschlossen ist. Beide Teile sind so konstruiert, daß sie im verschraubten Zustand in die Standardvorrichtung einer Zentrifuge passen. In die Vertiefung des Einsatz für die Zellpellets werden die Trägermaterialien, auf denen die Gewebezellen immobilisiert werden sollen, vorgelegt. Bei temperaturstabilen Trägermaterialien wird der Einsatz mit dem Oberteil verschraubt und dieser mit einem Diaphragma verschlossen. Die verschraubte Einheit wird bei 121°C autoklaviert. Bei nicht temperaturstabilen kann der Einsatz z. B. mit Ethylenoxid separat sterilisiert und anschließend mit dem autoklavierten Oberteil verschraubt werden.

Nach der Sterilisation wird über das Diaphragma mittels einer sterilen Spritze eine Suspension mit den Gewebezellen eingefüllt. In einer Zentrifuge werden die Zellen auf die Trägermaterialien aufzentrifugiert. Anschließend wird über das Diaphragma der zellfreie Überstand abgezogen und der Einsatz mit den jetzt aufzentrifugierten Zellen in die Kulturkammer eingesetzt. Die gesamten Arbeiten müssen unter sterilen Bedingungen erfolgen.

Fig. 4: Konstruktionszeichnung Kulturkammer

Fig. 4 zeigt eine mögliche Ausführungsform der Kulturkammer (1) mit mehreren Einsätzen für Zellpellets, den jeweiligen Einschraubeinsätzen (2) sowie der Abdeckung (3). Die Kulturkammer besteht aus einer Grundplatte, in die ein rechteckiger Kanal eingearbeitet ist. Über Schlauchanschlüsse und Verteilerschlitze (Zulauf (4), Ablauf (5)) kann Medium durch den Kanal gepumpt werden. In den Kanal sind mehrere Bohrungen gesetzt, in die entweder Blindverschlüsse oder die in Fig. 2 beschriebenen Einsätze mit aufzentrifugierten Zellpellet eingeschraubt werden.

Die Abdeckung kann entweder aus einem Sichtglas oder einer elastischen Membran bestehen, die es ermöglicht, mechanische Belastungen aufzubringen (siehe Fig. 5).

Fig. 5: Konstruktionszeichnung Belastungsapparat

Fig. 5 zeigt eine mögliche Ausführungsform der Bela-

stungsapparat. Der Reaktor (1) ist auf einer Grundplatte (2) befestigt, an deren Ecken vier Wellen (3) montiert sind. Gleitlager (4), die an den Ecken einer über dem Reaktor gelagerten Platte (5) angebracht sind, laufen auf diesen Wellen (4) in vertikaler Richtung. In dieser Platte sind von unten Stößel (6) angebracht, die die mechanische Belastung auf das Konstrukt übertragen sollen. Über einen pneumatischen Hubzylinder (7), der über ein Magnetventil angesteuert wird, kann eine dem gewählten Vordruck entsprechende Kraft in die Platte eingeleitet werden. Federn (8) an den Wellen bewirken eine schnelle Rückstellung beziehungsweise Entlastung. Mit Druckfedern an den einzelnen Stößeln (9) kann die auf das Konstrukt wirkende Kraft eingestellt werden. Des weiteren ist durch Abstandshalter (10) eine genau Vorgabe der Kompressionsstrecke möglich.

Projektrelevante Veröffentlichungen

- (1) Minuth, W.W., S. Kloth, J. Aigner, P. Steiner: MINUSHEET-Perfusionskultur. Simulation eines gewebetypischen Milieus. BIOSCOPE 4: 20-25 (1995).
- (2) Patentschrift DE 42 00 446 C2 (Minuth)
- (3) Patentschrift US 5.316.945 (Minuth)
- (4) N. M. Bachrach, W. B. Valhmu, E. Stazzone, A. Ratcliffe, W. M. Lai, V. C. Mow: Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment. J. BIOMECHANICS, Vol. 28, NO. 12, pp 1561-1569 (1995).

Patentansprüche

1. Verfahren zu Gewinnung von Gewebepellets, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen zunächst auf eine Trägermatrix aufzentrifugiert und anschließend in einer Perfusionskammer kultiviert werden.
2. Apparatur zur Kultivierung von Gewebezellen zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 bestehend aus einem Zentrifugationseinsatz und einer Perfusionskammer, dadurch gekennzeichnet, daß der Zentrifugationseinsatz teilbar ist und ein Teil in die Perfusionskammer eingesetzt werden kann.
3. Apparatur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer von oben mit einem Sichtglas versehen ist.
4. Apparatur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammer von oben mit einer elastischen Membran versehen ist.
5. Apparatur nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mechanische Stößel auf die Membran bzw. die Kulturen einwirken können.
6. Apparatur nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Stößel mit Druckfedern gehalten werden.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

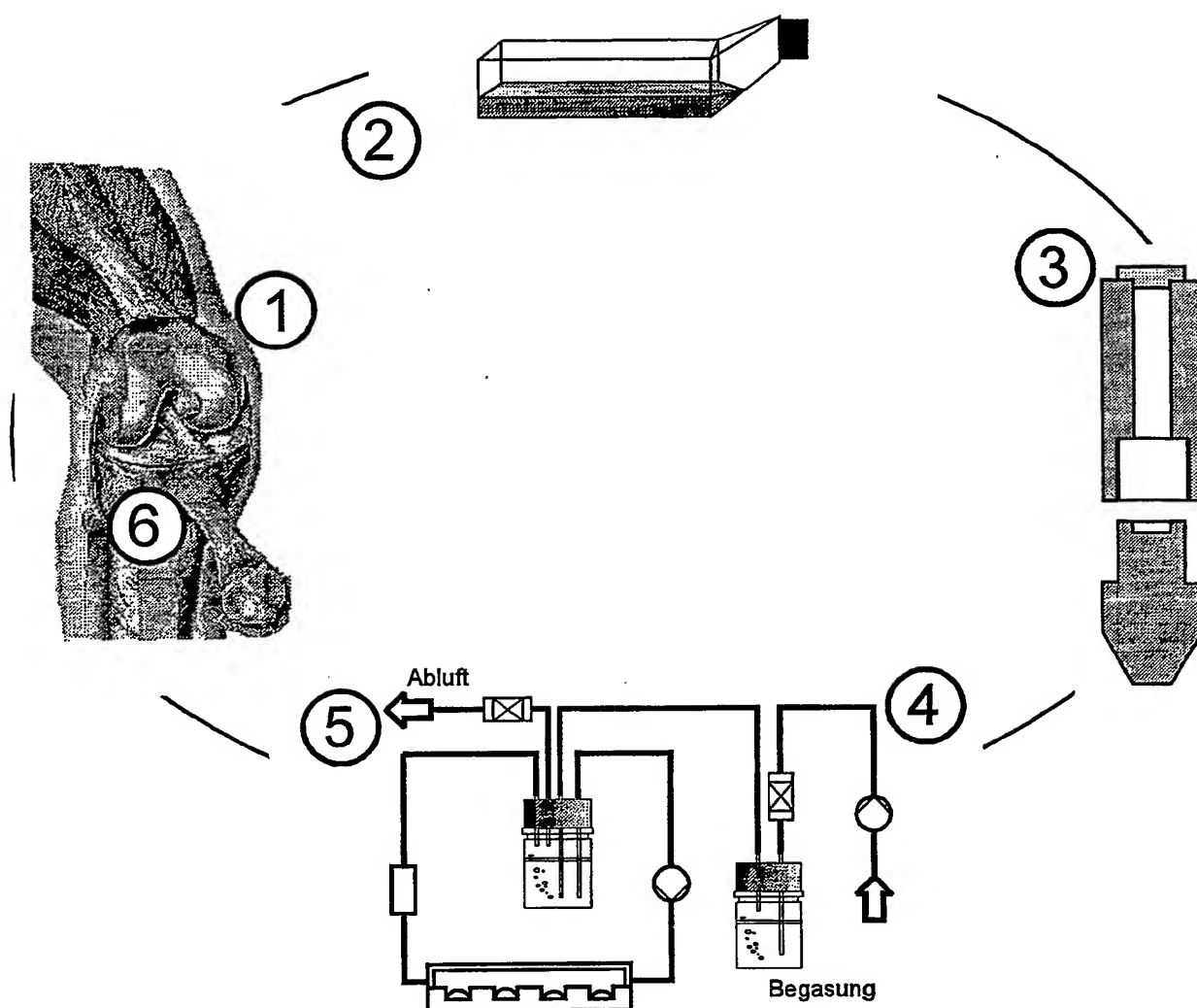


Fig. 2

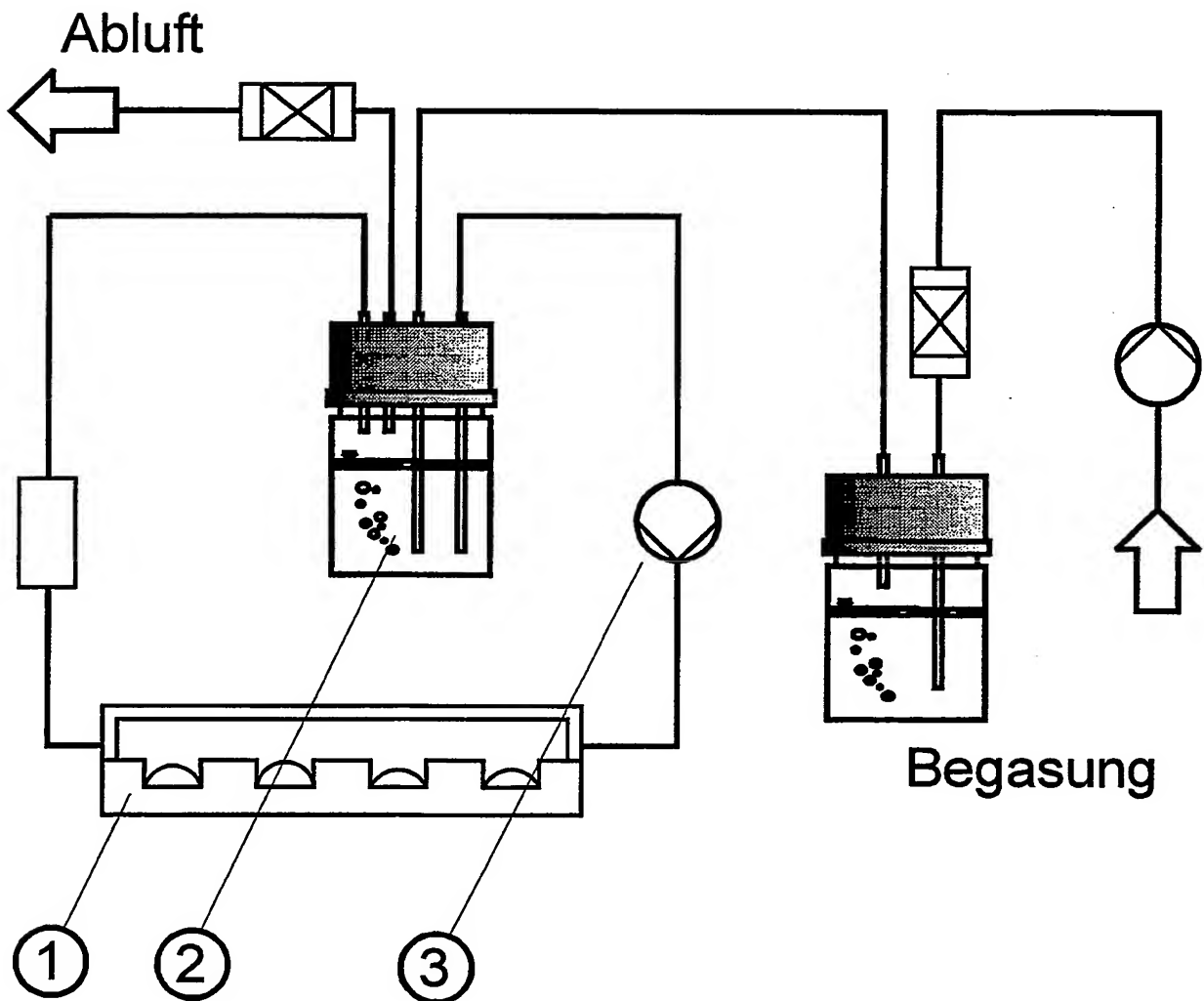


Fig. 3

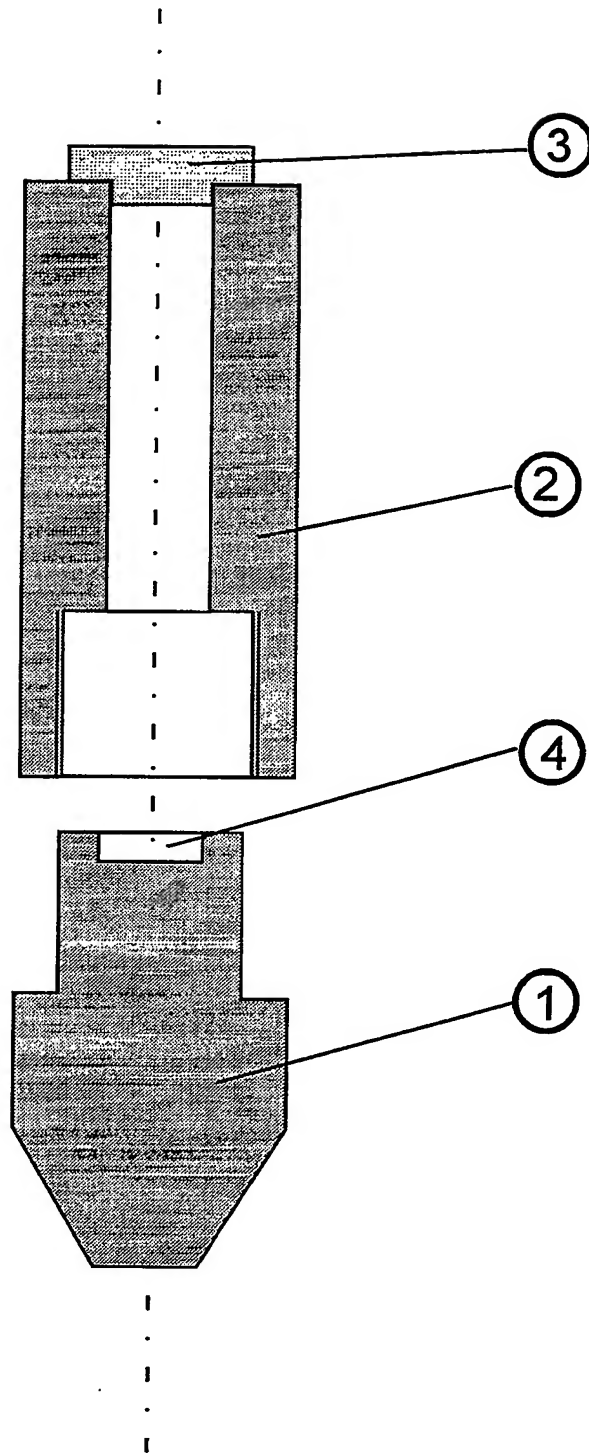


Fig. 4

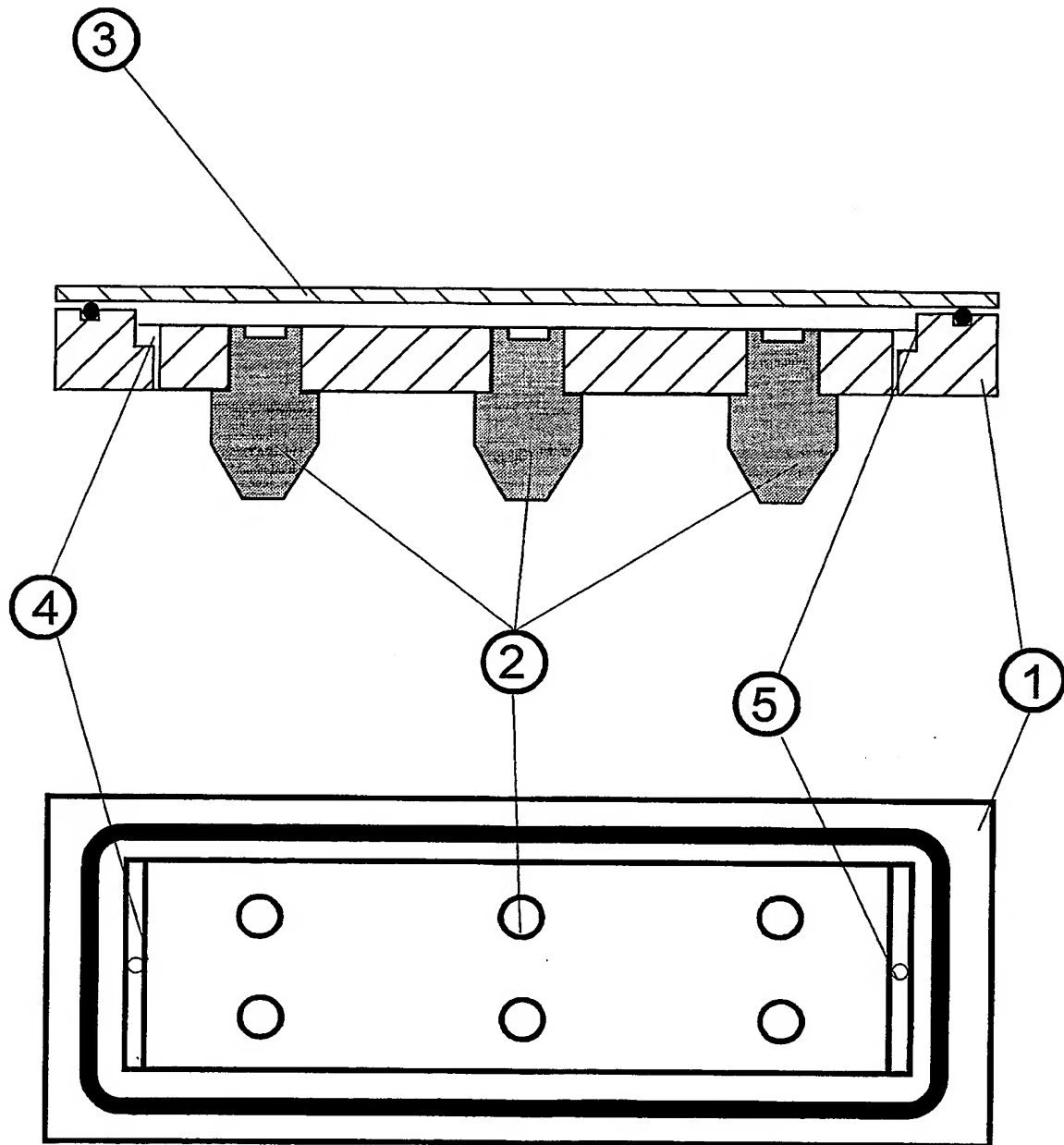
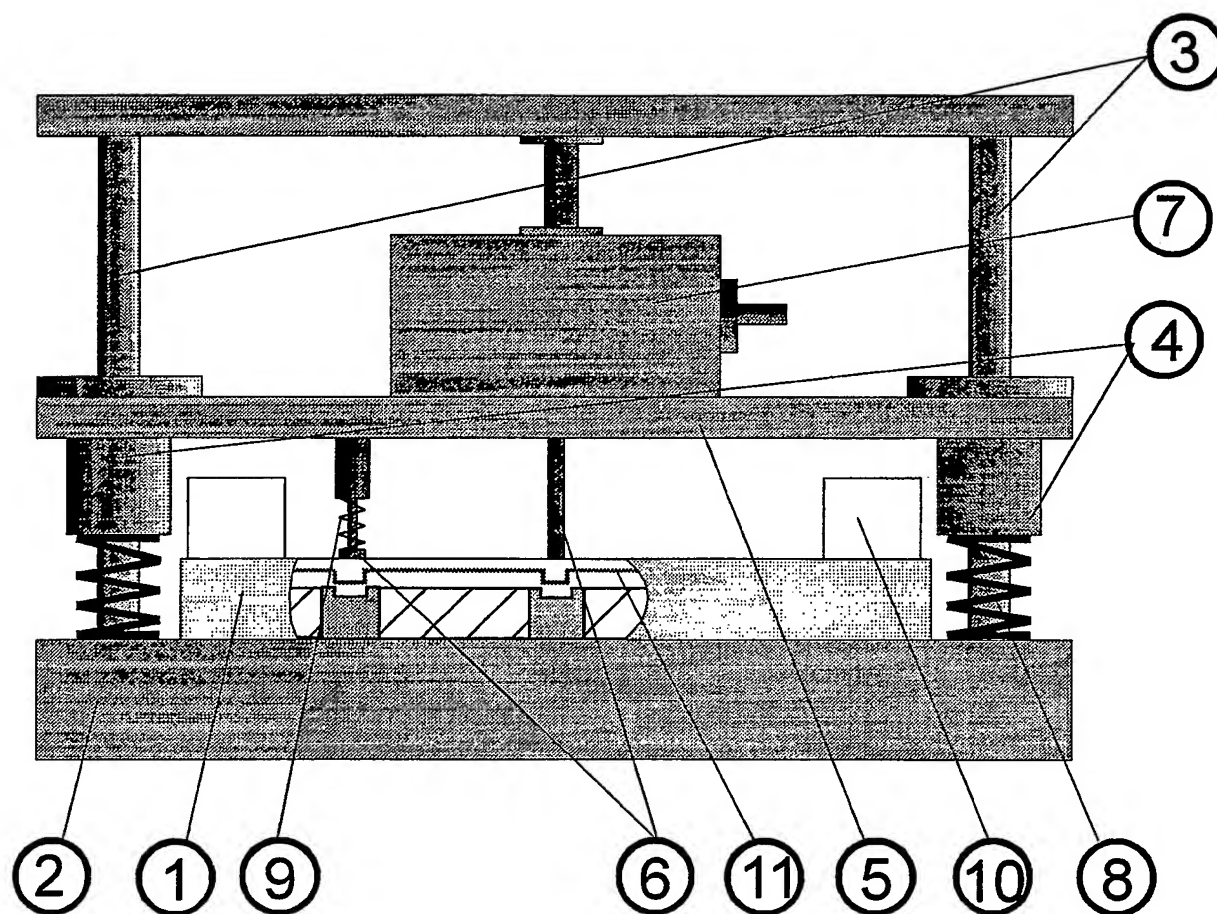


Fig. 5



Tissue engineering procedure extracting and culturing cells with mechanical stimulation to simulate in-vivo growth

Patent number: DE19808055
Publication date: 1999-09-02
Inventor:
Applicant: ADAMIETZ (DE); MEENEN (DE); NEHRING (DE);
POERTNER (DE)
Classification:
- international: C12M3/00; C12M3/00; (IPC1-7): C12N5/08; C12M3/00;
C12N5/06
- european: C12M3/00
Application number: DE19981008055 19980227
Priority number(s): DE19981008055 19980227

Report a data error here

Abstract of DE19808055

The cells are first centrifuged out onto a substrate, then cultivated in a perfusion chamber. An independent claim is included for an apparatus for cultivating tissue cells, using the method described comprising a centrifuge tube and perfusion chamber, the tube being separable, a part of it capable of introduction into the perfusion chamber.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

THIS PAGE BLANK

Docket # KUX-06101

-Applic: # _____

Applicant: Schulz, et al.

Lerner Greenberg Sterner LLP
Post Office Box 2480

Hollywood, FL 33022-2480
Tel: (954) 925-1100 Fax: (954) 925-1101